

16S RIBOSOMAL-RNA GENE, AND DETECTION OF PS. ALCALIGENES KB2 STRAIN BY USING DNA SEQUENCE IN THE GENE

Publication number: JP2000135085
Publication date: 2000-05-16
Inventor: YANO TETSUYA; IMAMURA TAKESHI; NOMOTO TAKESHI
Applicant: CANON KK
Classification:
- international: C12N15/09; C12N15/00; C12Q1/68; C12R1/38;
C12N15/09; C12N15/00; C12Q1/68; (IPC1-7):
C12N15/09; C12Q1/68; C12N15/09; C12R1/38;
C12Q1/68; C12R1/38
- european:
Application number: JP19980308835 19981029
Priority number(s): JP19980308835 19981029

Report a data error here

Abstract of JP2000135085

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new 16S rDNA gene of Pseudomonas alcaligenes KB2 strain having a specific base sequence, and usable for rapid, simple, specific and highly sensitive detection or the like of this microorganism useful for environmental clean-up or the like. **SOLUTION:** This gene is a new 16S rDNA gene of Pseudomonas alcaligenes KB2 strain, and is used for rapid, simple, specific and highly sensitive detection or the like of the Pseudomonas alcaligenes KB2 strain capable of degrading a hardly degradable compound such as an aromatic hydrocarbon and an organic chlorine-based compound causing soil pollution. The gene is obtained by constructing a DNA library by using 16S rRNA prepared by a conventional method from the Pseudomonas alcaligenes KB2 strain, and screening the library by using a partial fragment of the 16S rRNA gene of a known Gram-negative aerobic bacterium as a probe.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-135085

(P2000-135085A)

(43) 公開日 平成12年5月16日 (2000.5.16)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト [*] (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 6 3
// (C 1 2 N 15/09	Z N A		
C 1 2 R 1:38)			
(C 1 2 Q 1/68			

審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平10-308835	(71) 出願人	000001007 キヤノン株式会社 東京都大田区下丸子3丁目30番2号
(22) 出願日	平成10年10月29日 (1998. 10. 29)	(72) 発明者	矢野 哲哉 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ ノン株式会社内
		(72) 発明者	今村 剛士 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ ノン株式会社内
		(74) 代理人	100100893 弁理士 渡辺 勝 (外3名)
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 16S rRNA遺伝子及び該遺伝子中のDNA配列を用いた *Ps. alcaligenes* K B 2株の検出法

(57) 【要約】

【課題】 迅速、簡易かつ特異的に、しかも感度よくシェードモナス・アルカリゲネス K B 2株を検出、計数する方法を提供すること。

【解決手段】 シェードモナス・アルカリゲネス K B 2株から単離した16S rRNA遺伝子の塩基配列から選択した塩基配列を有するプローブまたはプライマーを用いてK B 2株の遺伝子工学的手法による検出を行う。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表の配列番号：1の塩基配列を有することを特徴とする16S rRNA遺伝子。

【請求項2】 以下の塩基配列：

(a) 配列表の配列番号：1の塩基配列、または(b) 配列表の配列番号：1の塩基配列と相補的な塩基配列、を有することを特徴とする核酸断片。

【請求項3】 シュードモナス・アルカリゲネス (*Pseudomonas alcaligenes*) KB2株の有する16S rRNA遺伝子検出用のプライマーまたはプローブとして有用な核酸断片であって、請求項2に記載の核酸断片の全配列またはその部分配列、あるいはこれらの配列に対して、前記16S rRNA遺伝子にハイブリダイズする機能を消失しない範囲で塩基の欠失、置換または付加による変異を施した変異配列を有することを特徴とするプライマーまたはプローブ用の核酸断片。

【請求項4】 前記プライマーとして利用可能な核酸が10～50塩基の長さであり、前記プローブとして利用可能な核酸が10塩基から最大塩基数までの長さを有する請求項3に記載の核酸断片。

【請求項5】 標識物を結合可能な部位及び固相担体と結合可能な部位の少なくとも1つが導入されている請求項3または4に記載の核酸断片。

【請求項6】 標識物を結合可能な部位及び固相担体と結合可能な部位の少なくとも1つが、前記核酸断片の5'末端側に導入されている請求項3～5のいずれかに記載の核酸断片。

【請求項7】 標識物を結合可能な部位または固相担体と結合可能な部位が、ビオチン残基、2, 4-ジニトロフェニル基またはジゴキシゲニン残基である請求項3～6のいずれかに記載の核酸断片。

【請求項8】 2種の核酸断片の組み合わせからなるシュードモナス・アルカリゲネス (*Pseudomonas alcaligenes*) KB2株の有する16S rRNA遺伝子検出用のプライマーセットであって、これらの核酸断片の少なくとも一方が、請求項3～7のいずれかに記載の核酸断片であることを特徴とするプライマーセット。

【請求項9】 シュードモナス・アルカリゲネス KB2株の存在の有無を、該株の有する16S rRNA遺伝子のプローブにより検出することで判定するシュードモナス・アルカリゲネス KB2株の検出方法であって、前記プローブとして、請求項3～7のいずれかに記載の核酸断片を用いることを特徴とする検出方法。

【請求項10】 シュードモナス・アルカリゲネス KB2株の存在の有無を、該株の有する16S rRNA遺伝子のプライマーを用いて検出することで判定するシュードモナス・アルカリゲネス KB2株の検出方法であって、

前記プライマーとして、請求項3～7のいずれかに記載の核酸断片または請求項8に記載のプライマーセットを用いることを特徴とする検出方法。

【請求項11】 請求項3～7に記載のプライマーまたは請求項8に記載のプライマーセットを用い、下記

(1)～(4)の工程：

(1) シュードモナス・アルカリゲネス KB2株の存在の有無を検出したい試料を準備する工程、(2) 必要に応じて、試料中の菌体の破碎処理を行う工程、(3) 試料中に上記プライマーを加えプライマーを起点とした核酸鎖の伸張反応を行う工程、(4) 工程(3)で得られた伸張反応物について検出操作を行う工程を有することを特徴とするシュードモナス・アルカリゲネス KB2株の検出方法。

【請求項12】 プライマーの伸張反応がPCR (Polymerase Chain Reaction) 法による請求項11に記載の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はシュードモナス・アルカリゲネス (*Pseudomonas alcaligenes*) KB2株の単離された16S rRNA遺伝子、並びに該遺伝子の塩基配列に基づいて得られ、該KB2株の検出に有用な新規核酸断片およびその用途に関する。詳しくは、該KB2株を検出するためのプライマーまたはプローブとして利用可能な核酸断片、およびその構成塩基配列の部分配列、およびこれらを用いた該KB2株の検出法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】近年、芳香族化合物、パラフィン、ナフテンなどの脂肪族炭化水素、あるいはトリクロロエチレンなどの有機塩素系化合物などによる環境汚染が問題となっており、すでに汚染されてしまった環境を浄化し、もとの状態に修復していく技術の確立が強く求められている。この環境修復技術としては種々の物理化学的な方法が知られているが、これらの方法は、汚染物質の単なる抽出、回収であり、無害な化合物に変換するものではないことに加えて、処理にかかるコスト、操作性、投下エネルギー量、処理範囲等の点に関しても効率的とはいえず、実用的な技術であるとは必ずしもいえない。

【0003】そこで、上記の物理化学的手法に対して、微生物を利用した処理が実用的な汚染環境の修復方法を提供できるものとして期待されている。ここで、汚染物質の多くは化学工業などで使用された合成物質であり、自然界に生息する微生物によってあまり分解されないためその処理が容易でないものが多いが、近年、土壤汚染を引き起こしている芳香族炭化水素や有機塩素系化合物などの難分解性化合物を分解することができる菌株が数多く分離されてきており、これらの微生物の利用による環境修復に対する期待が高まっている。

【0004】とりわけ、トリクロロエチレン分解菌の開発が盛んに進められており、その分解活性を向上させたり、あるいはトリクロロエチレン分解酵素の誘導物質を不要化したりした遺伝子組み換え菌の土壌への散布なども検討されはじめてきている。ここで、発明者らはシュードモナス・アルカリゲネスKB2株(FERM P-14644)がトリクロロエチレンを分解可能であることを明らかにしており、このような微生物を利用した環境浄化技術を普及させ、さらには、この技術を実用的かつ社会的に有効な技術として定着させていくためには、分解能力などにすぐれた菌の開発とともに、それらを導入した土壌における菌の活動、増殖、伝搬、生残、つまりは土壌中での菌の優占度、生育状況などを十分に把握していくことが重要な課題となる。これらの課題を解決していくためには、目的とする菌を選択的に検出することができる手法の確立が必要不可欠である。

【0005】各種細菌の検出方法として、種々の分離培養法が用いられている。一般的には特別な培地による選択培養を行うことが多い。この方法は簡便であるため広く用いられるが、目的とする菌のみが必ずしも選択的に培養されるとは限らない。たとえば、フェノールを分解可能な菌である上記のKB2株の場合、カテコールのカテコラーゼ、3-ジオキシゲナーゼによる分解産物である2-ヒドロキシムコン酸セミアルデヒドの黄色の着色を簡便な指標とすることができる。しかしながら、カテコールをメタ開裂により代謝可能な他の菌が存在する可能性もあり、厳密には黄色の着色のみをその指標とすることはできず、詳細な形態学的、あるいは生化学的な性状を検査する必要がある。ここで、形態学的、あるいは生化学的な性状から目的とする菌を検出するには数多の熟練と経験を要し、しかもその手法は煩雑であり時間がかかるなど、種々の実用面での問題があった。

【0006】また、目的とする菌に特異的な抗体を放射性同位元素または蛍光色素でラベルし検出に用いる方法が知られているが、この方法は抗体を得るのに非常に手間がかかる点と、抗体の特異性がロットにより大きくばらつく点が難点であった。

【0007】これらの方法にかわるものとして、生物種に特異的な核酸の塩基配列を、それに相補的な配列を持つオリゴヌクレオチドプライマーあるいはプローブを利用することにより検出する方法が発表されている。特に、リボゾーマルRNA(rRNA)は生物において必須の細胞構成成分であり、その構造は生物の進化の過程において比較的良好に保存されている。rRNAの中でも16S rRNAについては研究が進んでおり、多くの生物種についてその塩基配列が同定されてきている。16S rRNAには種々の生物で共通に保存されている領域と、生物種により配列の異なる可変領域のことが知られており、この可変領域に対応するDNAプライマーあるいはプローブを利用した菌の検出、同定法が近

年開発されてきた。たとえば、rRNAは細胞中に104個以上存在し、ハイブリダイゼーション法のターゲットとしては感度の面からも非常に有効なものであるが、ここで、目的とする菌を検出するためのプローブまたはプライマーをいかに選択するかこそが最も困難な課題となっており、この方法を利用するためには目的とする細菌の16S rRNA、あるいはその遺伝子の塩基配列を同定する必要がある。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】先述したように、特定の微生物を利用して土壌中の汚染物質の浄化処理を行う場合、処理条件や生育条件を最適にするためには、その微生物の土壌中での優占度や生育状況を知る必要がある。そのためには微生物を特異的に検出、計測できる方法が必要であるが、いままでの各種細菌の検出はフェノールを唯一の炭素源とする選択培地による培養や、抗体法などによるもので、その特異性、感度、簡便さ、検出に要する時間などの点で問題が多く、土壌中での菌の挙動をリアルタイムでモニタリングするための簡便な方法は見当たらないのが現状である。

【0009】本発明は上記従来技術の課題に鑑みなされたものであり、その目的は迅速、簡易かつ特異的に、しかも感度よくシュードモナス・アルカリゲネス KB2株を検出、計数する方法を提供することにある。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明によって、配列表の配列番号：1で表されるシュードモナス・アルカリゲネス(*Pseudomonas alcaligenes*)KB2株(以下、単にKB2株という)の16S rRNA遺伝子が提供される。この16S rRNA遺伝子の塩基配列に基づいて、KB2株の遺伝子工学的な手法を用いた検出におけるプローブやプライマーとして有用な核酸断片を得ることができる。この核酸断片は、上記の16S rRNA遺伝子の塩基配列に基づいて得られるプライマーとして利用可能な10～50塩基の長さのもの、更にはプローブとして利用可能な核酸が10塩基から各核酸の全塩基数以下の長さのものとして提供される。このプライマーまたはプローブとして利用される核酸断片には、標識物を結合し得る部位や、固相担体と結合可能な部位が導入することができ、これらの部位を利用して更に効率的なKB2株の検出が可能となる。

【0011】本発明は、また、これらのプライマーあるいはプローブを利用したKB2株の検出方法に関する。すなわち、プライマーを利用した本発明によるKB2株の検出方法は、上記のプライマー、好ましくは2種の組み合わせからなるプライマーを用いて、例えば、下記(1)～(4)の工程を実施することを特徴とするものである。

- (1) KB2株の有無を検出したい試料を準備し、
- (2) 必要に応じて、試料中の菌体の破碎処理を行い、

(3) 試料中に所定のプライマーを加え、プライマーを起点とした核酸鎖の伸張反応を行い、(4) 工程(3)で得られた伸張反応物について検出操作を行う。

【0012】また、プローブを利用した本発明によるKB2株の検出方法は、前記したようなプローブの少なくとも1種を用いることを特徴とするものである。

【0013】

【発明の実施の形態】以下、項目ごとに本発明を詳細に説明する。

(KB2株の16S rRNA遺伝子) 本発明における16S rRNA遺伝子はKB2株から単離されたものであり、本発明におけるKB2株にはその突然変異株も包含される。野生型のKB2株は、通産省工業技術院生命工学工業技術研究所にブタベスト条約に基づいて寄託されており、その受託日は平成6年11月15日であり、受託番号はFERMBP-5354である。また、自然界からの取得は、例えば特開平08-154668号公報に記載された方法で行うことができる。

【0014】本発明に係るKB2株の16S rRNA遺伝子は、配列表の配列番号：1の塩基配列を有するものであり、KB2株から単離されたもので、例えば後述する実施例に示す方法によりその塩基配列の決定がなされたものである。この16SrRNA遺伝子の有する塩基配列は、KB2株の遺伝子工学的手法を用いた検出方法におけるプローブやプライマーとして有用な核酸断片の塩基配列の選択の材料として有用である。また、この16S rRNA遺伝子の有する塩基配列と相補的な配列もまた同様の目的に有用なものである。

【0015】(核酸断片) KB2株の遺伝子工学的手法を用いた検出方法に使用し得るプローブやプライマーとして有用な核酸断片としては、配列表の配列番号：1の塩基配列またはその相補的配列から選択した部分配列または全配列を挙げることができる。更に、この核酸断片は、プローブやプライマーとしての機能が損なわれない、すなわち、検出対象とする16S rRNA遺伝子の塩基配列またはその部分配列との所定位置での結合やハイブリダイズが可能な範囲内での変異を有するものでも良い。

【0016】なお、配列番号：1の塩基配列またはその相補配列を有する核酸断片は、特にプローブとして好ましく、また、これらの部分塩基配列はプライマーまたはプローブとして使用することができる。ここで、部分塩基配列を用いる場合には、KB2株に、特異的で、他の細菌、たとえば*Ps. putida*、*Ps. aeruginosa*などの*Pseudomonas*属細菌、土壌よりよく分離される*Burkholderia*属細菌、*Alcaligenes*属細菌、*Xanthomonas*属細菌、*Agrobacterium*属細菌、*Enterobacteriaceae*属細菌、*Acinetobacter*属細菌などに相同性の少ない部分を選択

することが好ましい。部分塩基配列は具体的には、プライマーの場合、10～50塩基の長さのものが好ましく、プローブの場合は10塩基の長さから検出対象としての各塩基配列(例えば、16S rRNA遺伝子の全塩基配列またはその相補配列)の全塩基数(最大塩基数)までの長さのものが好ましい。

【0017】これらの核酸断片あるいはその部分塩基配列は、合目的な任意の方法により調製することができ、たとえば後述実施例に記載の方法に従い、配列全部または一部を化学合成してもよい。あるいは、化学合成したプライマーを利用してPCR法で増幅し、増幅断片をそのままプローブとして用いることも可能である。さらにはKB2株の遺伝子から制限酵素などを利用して直接切り出すことも可能であり、また、それらの遺伝子を*E. coli*などのプラスミドにクローニングし、菌の増殖の後にプラスミドを回収し、切り出して利用することも可能である。

【0018】本発明における上記核酸断片における変異としては、たとえば一部の塩基もしくは塩基配列の欠失、置換または付加などがあげられる。ここで核酸断片をプライマーとして利用する場合は、プライマーの伸張反応に大きな影響を与えられとされる3'末端付近は変異のないようにするか、あるいはあっても最小限にとどめることが好ましく、より好適には5'末端付近で変異があるようにする。

【0019】このような、プライマーまたはプローブとして利用可能な核酸断片または部分塩基配列は必要に応じて標識物を結合可能な部位及び固相担体と結合可能な部位の少なくとも1つが導入されていてもよい。ここで、プライマーを利用した検出を行う場合、標識物または固相担体と結合可能な部位が導入可能な位置はプライマーの伸張反応を妨げない位置ならばどこでもよいが、可能であれば5'末端が好ましい。また、プローブを利用した検出を行う場合、標識物または固相担体と結合可能な部位が導入可能な位置は3'末端や5'末端の水酸基部分さらには塩基部分やリン酸ジエステル部分などが考えられるが、プローブの塩基配列の長さなどを考慮し、ハイブリダイゼーションの妨げにならないようにすることが望ましい。

【0020】(標識物または固相担体と結合可能な部位) 上記核酸をプローブまたはプライマーとして利用する場合の標識物としては、放射性物質、非放射性物質のどちらを用いてもよい。非放射性の標識物で直接標識可能なものとしては、フルオレセイン誘導体、ローダミンおよびその誘導体などの蛍光物質、化学発光物質、遅延蛍光物質などがあげられる。また、標識物と特異的に結合する物質を利用し間接的に標識物を検出することも可能である。こうした標識物としてはビオチン、ハプテンなどがあげられ、ビオチンの場合アビジンあるいはストレプトアビジンを、ハプテンの場合はこれに特異的に結

合する抗体を利用する。ハブテンとしては、2, 4-ジニトロフェニル基を有する化合物やジゴキシゲニンなどを使うことができる。これらの標識物はいずれも単独あるいは必要に応じ複数種を組み合わせて、プローブまたはプライマーに導入可能である。

【0021】サンドイッチハイブリダイゼーションなど核酸の特定断片を固相担体に特異的に結合する必要がある場合は、固相担体と結合可能な部位は、該担体と選択的に結合可能なものであれば何であってよい。たとえば、ビオチンあるいはフルオレセイン、2, 4-ジニトロフェニル基を有する化合物やジゴキシゲニンなどのハブテンがあげられ、これらはいずれも単独あるいは必要に応じ複数種を組み合わせて、プローブまたはプライマーに導入可能である。

【0022】(プローブを用いた検出法) プローブを用いた本発明によるKB2株の検出法の一態様は、先に説明した核酸断片をプローブとして用いる方法である。このプローブを用いる検出方法には、ドットハイブリダイゼーション法、サザンハイブリダイゼーション法、*in situ*ハイブリダイゼーション法等を適用することができ、必要に応じて上記の標識物を利用して16S rRNA遺伝子あるいはその予め特定された部分配列とのハイブリッド体の検出を行うことで、KB2株の検出を行うことができる。なお、通常のハイブリダイゼーション法を適用する場合には、常法に従ってハイブリダイゼーション反応及び検出を行うことができる。また、*in situ*ハイブリダイゼーションにおいても、本発明における核酸断片を検出に供することが可能である。更に、ハイブリダイゼーション操作の簡易化のためにサンドイッチハイブリダイゼーションを基本とする方法が開発されており、これらの方法も本発明における核酸断片を利用したKB2株の検出に適用することができる。

【0023】(プライマーを用いた検出法) プローブを用いた本発明によるKB2株の検出法の他の態様は、プライマーを用いた方法である。この検出法は、先に述べた核酸断片をプライマーとして用い、標的とする16S rRNA遺伝子の部分塩基配列に対応する配列を有する核酸断片をプライマーを起点とした伸張反応により形成してこれを検出する方法である。用いるプライマーの数は所望とする検出精度が得られるように選択される。

【0024】より好ましい例としては、後述するような2種の異なるプライマーによる遺伝子増幅反応により試料中の微量核酸断片を増幅するPCR (Polymerase Chain Reaction) 法を用いた検出法を挙げることができる。ここで2種のプライマーの基本的な形態としては、たとえば、2種のプライマーともに何の修飾もされていないもの、2種のプライマーのうち少なくとも一方に検出可能な標識または固相担体と結合可能な部分が導入されたもの、2種のプライマーのうち一方に標識物が導入され、他方に固相担体と結合可

能な部位が導入されたもの、2種のプライマーともに固相担体と結合可能な部分が導入されたもの、などがあげられる。

【0025】本発明によるKB2株の検出方法は前記したような本発明によるプライマー、好ましくは2種の組み合わせからなるプライマーを用いて以下のように実施することができる。

【0026】(1) KB2株の有無を検出したい試料を準備し、(2) 必要に応じて、試料中の菌体の破砕処理を行い、(3) 試料中に上記プライマーを加えプライマーを起点とした核酸鎖の伸張反応を行い、(4) 工程(3) で得られた伸張反応物について検出操作を行う。

【0027】ここで、プライマー伸張反応により増幅された核酸断片の検出は、電気泳動、あるいはハイブリダイゼーションなどの通常用いられる方法を利用してもよいし、遺伝子の増幅反応においてそれぞれのプライマーに別々の標識を導入しておき、増幅反応後生成物を固相担体に吸着し、生成物を選択的に検出する方法などを用いることも可能である。ここで固相担体としてはポリスチレンボール、アガロースビーズ、ポリアクリルビーズ、ラテックス、マイクロタイターウェルなどの固相材料に、プライマー中に導入された結合部位を捕捉可能であるような、ストレプトアビジン、抗体などを導入したものがあげられる。たとえば、ビオチンが導入されたプライマーからのPCR産物を捕捉するには、ストレプトアビジンを固相に結合した担体を、フルオレセインなどが導入されたプライマーからの伸張反応物を捕捉するには、それぞれに対する抗体を固相に結合した担体を用いればよい。さらに、固相担体を微粒子とすることにより、目的とする核酸を凝集、あるいは沈澱の有無により簡便に判定することもできる。また、一方のプライマーに固相担体と結合可能な部位を、他方のプライマーに標識物を導入したものをを用いて、伸張反応を行った反応物を固相担体と接触させた後に不純物を適当な溶媒で洗浄除去する方法が考案されており、目的核酸は標識物を持つ形で該固相担体に固定され特異的に検出される。これら標識物質の実際の検出は、使用する標識物質に応じて一般的な手法を用いればよい。たとえば、標識物質がラジオアイソトープであれば、そのまま活性を測定すればよいし、たとえばビオチンであればアビジン-酵素結合体、また、ハブテンであれば抗体-酵素結合体などを用いてAMP PDなどの基質と反応させ、色的、蛍光的手段により検出を行えばよい。

【0028】また、遺伝子の増幅反応に用いる酵素、反応条件などについてはさまざまな方法が考案されているが、本発明における核酸断片は、種々のPCR法に利用するのに十分な長さおよび塩基配列を有しており、これを用いることでKB2株の検出を行うことができるものである。

【0029】

【実施例】実施例1

(KB2株の16S rRNA遺伝子のクローニングと塩基配列の決定) 既知のグラム陰性好気性菌の16S rRNAより、以下の2つの共通塩基配列を選び出した。

配列1: 5'-GGCGAACGGGTGAGTAATAC-3' (配列番号: 2)

配列2: 5'-CTTACCCAGTCACGAACC-3' (配列番号: 3)

【0030】配列1からなる合成DNAと配列2からなる合成DNAを常法により合成し、これらをプライマーとして、KB2株から常法により調製したDNAに対してPCRを行った。増幅された約1.4kbのDNA断片を、プラスミドpUC119のHinc II切断部位に挿入し、大腸菌JM109に形質転換した。

【0031】形質転換株を、アンピシリン、IPTG、X-galを含む寒天培地上で選択し、生じた白色コロニーよりプラスミドを調製し、挿入断片の有無を調べた。約1.4kbのDNA断片が挿入されている組み換えプラスミドを選択し、上記PCR断片の末端の塩基配列をダイデオキシ法により決定した。これを既知の各種細菌の16S rRNAの塩基配列と比較したところ、保存領域においては非常に相関性が高く、この挿入断片はKB2株の16S rRNA部分配列であると推定した。

【0032】次に、PCRを経由しない、完全長の16S rRNA遺伝子のクローニングを以下のように行った。KB2株から常法により調製したDNAを制限酵素Sau3A Iで部分分解し、アガロースゲル電気泳動により9~23キロ塩基対断片を分離、精製し、これらのDNA断片をλDASH II (STRATAGENE)のBamH I消化物に挿入した。Gigapack II Gold extract (STRATAGENE)を用いて、インビトロパッケージング法によりファージ粒子の調製を行い、DNAライブラリーを作製した。ここで、上記16S rRNA遺伝子部分断片をプローブとして、該DNAライブラリーからブランクハイブリダイゼーション法により陽性ファージのスクリーニングを行った。陽性ファージは500個に1個程度の割合で取得できた。常法により陽性ファージを培養の後、塩化セシウム密度勾配法によりファージDNAを精製した。

【0033】塩基配列の決定は段階欠失クローンと、16S rRNA遺伝子内の制限酵素切断部位を利用して得たサブクローンをを用いて行った。欠失は、プラスミドpUC119のHinc II切断部位に完全長の16S rRNA遺伝子をリクローニングの後、Exonuclease IIIとMung Bean Nucleaseにより段階的に導入した。これらの段階欠失クローンおよび制限酵素を利用したサブクローンをを用いて、ダイデオキシ法により塩基配列の決定を行った。こうして決定されたKB2株の16S rRNAの塩基配

列は、配列番号1の塩基配列である。

【0034】実施例2

(プライマーの調製) 標識物あるいは固相担体と結合可能な部位が導入されているプライマー、あるいは導入されていないプライマーは、以下に示す化学合成法により調製した。

【0035】まず、標識物あるいは固相担体と結合可能な部位がいずれも導入されていないものは、DNA自動合成機モデル381A (パーキンエルマー)を用いて、ホスホアミダイト法により0.2μmolスケールで合成を行い、OPCカートリッジ (パーキンエルマー)により精製した。

【0036】また、標識物あるいは固相担体と結合可能な部位が導入されているプライマーは、まずその5'末端にアミノ基を導入したオリゴヌクレオチドとして合成し、その後に適当な試薬を用いて標識物あるいは固相担体と結合可能な部位を導入した。以下にその例を示す。

【0037】5'末端にアミノ基を導入したオリゴヌクレオチド: 5'-CCTTCGGGCCTGTGCTACTA-3' (配列番号: 4)の合成は、上述したような合成反応により5'末端に最後の塩基(この場合はC)を付加した後、アミノリンクII (パーキンエルマー)をさらに付加することにより行い、合成終了後、OPCカートリッジにより精製した。ビオチン化は、以下のようにして行った。10. D.のアミノ化オリゴヌクレオチド水溶液10μlに、1M NaHCO₃水溶液10μl、水30μl、および20μg/μlのビオチン-N-ヒドロキシサクシニミドエステル(BRL)のDMF溶液を50μl加え、混和後室温で放置した。4時間後、セファデックスG-50を担体としたゲルろ過にかけ、50mM TEAB (重炭酸トリエチルアンモニウム)緩衝液(pH 7.5)で溶出し、最初のピークを集め乾固の後、TE緩衝液(pH 8.0)に溶解した。

【0038】5'末端にジニトロフェニル基(DNP)を導入したオリゴヌクレオチド: 5'-CCATCTCTGGTAAGTCTCTGC-3' (配列番号: 5)は、ビオチン標識のときと同様に、まずその5'末端にアミノ基を導入したオリゴヌクレオチドとして合成および精製を行った。このようにして得た20. D.のアミノ化オリゴヌクレオチド水溶液180μlに、1M NaHCO₃水溶液20μlを加え、これに5% (v/v) ジニトロフルオロベンゼンのエタノール溶液100μlを加え37℃で2時間加温し、反応を行った。精製は、ビオチン化オリゴヌクレオチドと同様にゲルろ過により行い、乾固の後、TE緩衝液(pH 8.0)に溶解した。

【0039】実施例3

(プローブの調製) 3'末端にビオチン標識を導入したオリゴヌクレオチド: 5'-ACGGAACGAAAGCCTGGGCTAATATCCCGGGTCATG-3' (配列番号: 6)を調製した。あらかじめ3'末端がビオチン標識されている、0.5μmol

1スケールの3' Biotin-ONCPGカラム (CLONTECH) を用いて、ホスホアミダイト法によりオリゴヌクレオチドを合成し、常法によりOPCカートリッジを用いて精製、乾固の後、TE緩衝液 (pH8.0) に溶解した。

【0040】実施例4

(プライマーの特異性の評価) KB2株、JM1株、*B. cepacia* KK01株、*P. putida* BH株、*P. aeruginosa* (IFO 3080)、*P. fluorescens* (IFO 14160)、*Alcaligenes faecalis* (IFO 14479)、*Xanthomonas maltophilia* (IFO 14161)、*Enterobacter cloacae* (IFO13535)、*E. coli* JM109株の10種の細菌を用いて、常法により各種細菌よりDNAを調製したものを試料とし、PCR法によりプライマーの特異性を評価した。

【0041】なお、JM1株及びKK01株はともに通産省工業技術院生命工学工業技術研究所にブタベスト条約に基づいて寄託されており、受託日及び受託番号は以下のとおりである。

【0042】JM1株:

受託日: 平成7年1月10日、受託番号: FERM B P-5352

KK01株:

受託日: 平成4年3月11日、受託番号: FERM B P-4235 (*Pseudomonas cepacia*-KK01として寄託)

【0043】また、プライマーは実施例2で調製した2種のプライマー: 5'-Biotin-CCTTCGGGCCTTGTGCTACTA-3' 及び5'-DNP-CCATCTCTGGTAAGTTCCTGC-3' を用いた。PCRは、以下の反応溶液組成ならびに条件で行った。

【0044】50 pmol/ μ l 濃度の上記プライマーをそれぞれ1 μ l ずつ、酵素に添付の反応緩衝液を5 μ l、酵素に添付のdNTP混合溶液を5 μ l、試料DNAを10 ng 加え、さらに水を加えて反応溶液全量を50 μ l とした。これに、Ampli Taq DNA polymerase (宝酒造) を1 unit 加え、95℃に加熱して5分間保持した後、95℃・20秒、55℃・30秒、72℃・60秒を1サイクルとした30サイクルの反応を行い、反応後さらに72℃で5分間保温した。反応後、50 μ l より2 μ l を分取し、アガロースゲル電気泳動、エチジウムブロマイド染色を行い、増幅核酸鎖の検出を行った。その結果、KB2株においてのみ、期待される約810塩基対の長さ、明瞭な一本のバンドが確認できた。ここで、他の9種の菌株においては、いかなる増幅核酸鎖もまったく検出することはできなかった。

【0045】実施例5

(KB2株のプライマーを用いた検出(1)) 実施例4と同様にして、10種類の各種細菌よりDNAを調製した。これを以下の反応溶液組成、反応条件でPCRに供した。

【0046】実施例2で調製した、20 pmol/ μ l 濃度のプライマー、5'-Biotin-CCTTCGGGCCTTGTGCTACTA-3' 及び5'-DNP-CCATCTCTGGTAAGTTCCTGC-3' をそれぞれ1 μ l ずつ、酵素に添付の反応緩衝液を5 μ l、酵素に添付のdNTP混合溶液を2 μ l、試料DNAをKB2株は10 pg を、他の細菌については10 ng を加え、さらに水を加えて反応溶液全量を50 μ l とした。これに、Ampli Taq DNA polymerase (宝酒造) を1 unit 加え、95℃に加熱して5分間保持した後、95℃・20秒、55℃・30秒、72℃・60秒を1サイクルとした35サイクルの反応を行い、反応後さらに72℃で5分間保温した。この反応混合液をスピンカラムにかけ、未反応プライマーを除去した。

【0047】ストレプトアビジン固定化マイクロプレートに、0.15M NaCl、0.05% Tween 20を含むTris-Cl緩衝液 (pH7.5) を100 μ l 加えておき、これに反応後の上記混合液を10 μ l 加え、室温30分間放置の後、上記緩衝液500 μ l で3回洗浄した。これにアルカリ性フォスフォターゼ標識抗DNP抗体を上述の緩衝液で2000倍に希釈したものを100 μ l 加え、室温30分間放置の後、上記緩衝液500 μ l で3回洗浄した。これに、4 mg/ml の濃度で1Mジエタノールアミン緩衝液に溶解した、p-ニトロフェニルリン酸溶液を100 μ l 加え、室温30分間放置の後、マイクロプレートリーダーを用いて405 nmの吸光度を測定した。その結果、KB2株においてのみ、バックグラウンドに比較し有意な吸収を確認することができた。ここで、他の9種の菌株においては、バックグラウンド程度の吸収を示すにとどまった。

【0048】実施例6

(KB2株のプライマーを用いた検出(2)) 実施例4と同様にして、KB2株よりDNAを調製した。これを以下の反応溶液組成、反応条件でPCRに供した。

【0049】実施例2で調製した、20 pmol/ μ l 濃度のプライマー、5'-Biotin-CCTTCGGGCCTTGTGCTACTA-3' 及び5'-DNP-CCATCTCTGGTAAGTTCCTGC-3' をそれぞれ1 μ l ずつ、酵素に添付の反応緩衝液を5 μ l、酵素に添付のdNTP混合溶液を2 μ l、試料としてKB2株より調製したDNAを、10 pg、1 pg、100 fg、10 fg 加え、さらに水を加えて反応溶液全量を50 μ l とした。これに、Ampli Taq DNA polymerase (宝酒造) を1 unit 加え、95℃に加熱して5分間保持した後、95℃・20秒、55℃・30秒、72℃・60秒を1サイクルとした40サイクルの反応を行い、反応後さらに72℃で5分間保温した。この反応混合液をスピンカラムにかけ、未反応プライマ

ーを除去した。

【0050】ストレプトアビジン固定化マイクロプレートに、0.15M NaCl、0.05% Tween 20を含むTris-Cl緩衝液(pH7.5)を100 μ l加えておき、これに反応後の上記混合液を10 μ l加え、室温30分間放置の後、上記緩衝液500 μ lで3回洗浄した。これにアルカリ性フォスフォターゼ標識抗DNP抗体を上記の緩衝液で2000倍に希釈したものを100 μ l加え、室温30分間放置の後、上記緩衝液500 μ lで3回洗浄した。これに、4mg/mlの濃度で1Mジエタノールアミン緩衝液に溶解した、p-ニトロフェニルリン酸溶液を100 μ l加え、室温30分間放置の後、マイクロプレートリーダーを用いて405nmの吸光度を測定した。その結果、DNA量が10pg、1pg、100fgのものについてバックグラウンドに比較し有意な吸収を確認することができた。ここで、DNA量が10fgのものについては、バックグラウンド程度の吸収を示すにとどまった。

【0051】実施例7

(KB2株のプローブを用いた検出(1))実施例4と同様にして、10種類の各種細菌よりDNAを調製した。それぞれのDNAをアルカリ変性の後、ドットプロット装置(BRL)を用いて1 μ gずつナイロン膜(Tropilon-45、Tropix社)にプロットした。80℃で2時間乾燥の後、ナイロン膜をビニールバッグに入れ、プレハイブリダイゼーション溶液(6 \times SSC、5 \times デンハルト溶液、0.5% SDS、100 μ g/ml変性サケ精子DNA)を3ml加え、60℃でプレハイブリダイゼーションを1時間行った。これに、ハイブリダイゼーション溶液(プレハイブリダイゼーション溶液に実施例3で調製したビオチン標識オリゴヌクレオチドプローブ:5'-ACGGAACGAAAGCCTGGGGCTAATATCCCCGGTCATG-Biotin-3'を熱変性の後に100ng加えたもの)を3ml加え、60℃で2時間ハイブリダイゼーションを行った。ナイロン膜をビニールバッグから取り出し、6 \times SSC、0.5% SDS溶液を用いて60℃で5分間ずつ3回洗浄した。検出はサザンライト(Tropix社)を用いて、アルカリ性フォスフォターゼ標識ストレプトアビジンとAMPPDによる化学発光法を利用して、添付のプロトコルに従い行った。

【0052】その結果、KB2株DNAをプロットしたものについてのみ、きわめて強い陽性の反応を確認できた。ここで、他の9種の菌株においては、陽性の反応を検出することはできなかった。

【0053】実施例8

(KB2株のプローブを用いた検出(2))実施例4に記載の10種類の各種細菌を常法により培養した。0.

配列番号: 1

配列の長さ: 1390

配列の型: 核酸

1Mりん酸ナトリウム緩衝液(pH8.0)で洗浄の後、前記緩衝液を用いてそれぞれの菌数が 2×10^7 cells/mlになるよう調製した。このようにして調製した菌懸濁液50 μ lに6%のホルムアルデヒド溶液を50 μ l加え菌体を固定し、0.1%ゼラチン、0.01%クロムミョウバンでコートしたスライドグラスに30 μ lを滴下し、風乾した。試料を固定したスライドグラスを、90%メタノール、3%ホルムアルデヒド溶液に10分間浸けて菌体を再固定した後、純水で洗浄した。

【0054】上記処理を行ったスライドグラスを、50mM NaBH₄を含む10mMTris-Cl緩衝液(pH8.0)に室温で30分間、遮光状態で浸した後、純水で洗浄、風乾した。プローブは実施例3で調製したビオチン標識オリゴヌクレオチドプローブ:5'-ACGGAACGAAAGCCTGGGGCTAATATCCCCGGTCATG-Biotin-3'に、FITC(Fluorescein isothiocyanate)標識されたストレプトアビジンをあらかじめ結合させたものを用いた。この標識プローブを、ハイブリダイゼーション溶液(0.1M Tris-Cl緩衝液(pH8.0)、0.75M NaCl、5mM EDTA、10%硫酸デキストラン、0.2% BSA(Bovine Serum Albumin)、0.01%ポリアデニル酸)で5ng/ μ l濃度とし、30 μ lを滴下した。スライドグラスを気密性の容器に入れて、45℃、1時間の反応を遮光状態で行った。

【0055】反応後、SET緩衝液(Tris-Cl(pH8.0)、0.2mM EDTA、30mM NaCl)でスライドグラスを洗浄し、遮光状態で風乾の後、オリンパスの落射型蛍光顕微鏡で検鏡を行い蛍光の有無を調べた。励起光源は水銀ランプを使用し、B励起により観察を行った。検鏡の結果、KB2株については菌体に蛍光が認められたが、他の細菌では蛍光を観察することはできなかった。

【0056】

【発明の効果】本発明の核酸断片は、KB2株の16SrRNAをコードする遺伝子であり、これらの構成塩基またはその一部分の塩基配列をプライマーまたはプローブとして利用すれば、KB2株の検出を特異的に行うことができる。

【0057】また、本発明によるKB2株の検出方法は、上記の核酸断片あるいはこれらの一部をプライマーまたはプローブとして用いるものであり、感度、特異性、簡便さ、迅速性の点で優れたものであり、環境浄化などの分野で多大な貢献をなすものである。

【0058】

【配列表】

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：染色体DNA

起源

生物名：シュードモナス・アルカリゲネス KB 2株

配列の特徴：16S rRNA遺伝子

配列：

```

GGCGAACGGG TGAGTAATAC ATCGGAACGT GCCTAGTAGT GGGGGATAAC TACTCGAAAG 60
AGTAGCTAAT ACCGCATGAG ATCTACGGAT GAAAGCAGGG GACCTTCGGG CCTTGTGCTA 120
CTAGAGCGGC TGATGGCAGA TTAGGTAGTT GGTGGGGTAA AGGCTTACCA AGCCTGCGAT 180
CTGTAGCTGG TCTGAGAGGA CGACCAGCCA CACTGGGACT GAGACACGGC CCAGACTCCT 240
ACGGGAGGCA GCAGTGGGGA ATTTTGACA ATGGGCGAAA GCCTGATCCA GCAATGCCGC 300
GTGCAGGATG AAGGCCCTCG GGTGTAAAC TGCTTTTGTG CGGAACGAAA AGCCTGGGGC 360
TAATATCCCC GGGTCATGAC GGTACCGTAA GAATAAGCAC CGGCTAACTA CGTGCCAGCA 420
GCCGCGGTAA TACGTAGGGT GCAAGCGTTA ATCGGAATTA CTGGGCGTAA AGCGTGCGCA 480
GGCGGTTTGG TTAGACAGTG GTGAAATCCC CGGGCTCAAC CTGGGAACCTG CCATTGTGAC 540
TGCAAGGCTA GAGTGGCGCA GAGGGGGATG GAATTCGCG TGTAGCAGTG AAATGCGTAG 600
ATATGCGGAG GAACACCGAT GGCGAAGGCA ATCCCCTGGG CCTGCACTGA CGCTCATGCA 660
CGAAAGCGTG GGGAGCAAAC AGGATTAGAT ACCCTGGTAG TCCACGCCCT AAACGATGTC 720
AACTGGTTGT TGGGTCTTAA CTGACTCAGT AACGAAGCTA ACGCGTGAAG TTGACCGCCT 780
GGGGAGTACG GCCGCAAGGT TGAAGCTCAA AGGAATTGAC GGGGACCGC ACAAGCGGTG 840
GATGATGTGG TTAATTCGA TGCAACGCGA AAAACCTTAC CCACCTTTGA CATGGCAGGA 900
ACTTACCAGA GATGGTTTGG TGCTGAAAG AGAACCTGCA CACAGGTGCT GCATGGCTGT 960
CGTCAGCTCG TGTCGTGAGA TGTGGGTTA AGTCCCGCAA CGAGCGCAAC CCTTGCCATT 1020
AGTTGTCTACA TTCAGTTGAG CACTCTAATG GGAATGCGG TGACAAACCG GAGGAAGGTG 1080
GGGATGACGT CAAGTCCTCA TGGCCCTTAT AGGTGGGGCT ACACAGTCA TACAATGGCT 1140
GGTACAAAGG GTTGCCAACC CGGAGGGGG AGCTAATCCC ATAAAGCCAG TCGTAGTCCG 1200
GATCGCAGTC TGCAACTCGA CTGCGTGAAG TCGGAATCGC TAGTAATCGT GGATCAGAAAT 1260
GTCAACGTGA ATACGTTCCC GGGTCTTGTA CACACCGCCC GTCACACCAT GGGAGCGGGT 1320
CTCGCCAGAA GTAGGTAGCC TAACGCAAG GAGGGCGCTT ACCACGGCGG GGTTCGTGAC 1380
TGGGGTGAAG 1390

```

配列番号：2

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の特徴：16S rRNA共通配列増幅用プライマー配列

配列：

GGCGAACGGG TGAGTAATAC 20

配列番号：3

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の特徴：16S rRNA共通配列増幅用プライマー配列

配列：

CTTACCCCA GTCACGAACC 20

配列番号：4

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の特徴：シュードモナス・アルカリゲネス KB2株検出用プライマー配列

配列：

CCTTGGGCC TTGTGCTACTA 21

配列番号：5

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の特徴：シュードモナス・アルカリゲネス KB2株検出用プライマー配列

配列：

CCATCTCTGG TAAGTCCTGC 21

配列番号：6

配列の長さ：39

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の特徴：シュードモナス・アルカリゲネス KB2株検出用プローブ配列

配列：

ACGGAACGAA AAGCCTGGGG CTAATATCCC CGGGTCATG 39

フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁷

識別記号

F I

キーワード(参考)

C12R 1:38)

(72)発明者 野本 毅

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ

ノン株式会社内

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA17 AA20 BA80 CA01

CA09 CA11 DA05 DA06 EA04

GA11 HA09 HA11

4B063 QA01 QA13 QA18 QQ06 QQ19

QQ42 QR31 QR33 QR41 QR56

QR62 QR66 QR75 QS02 QS16

QS25 QX01